






Isolation of exogenous recombinant proteins from the milk of transgenic mammals

Patent number: DE3854555T
Publication date: 1996-04-04
Inventor: MEADE HARRY (US); LONGBERG NILS (US)
Applicant: GENE PHARMING EUROP BV (NL)
Classification:
- **international:** **C07K14/47; C12N9/72; C12N15/85; C07K14/435; C12N9/72; C12N15/85;** (IPC1-7): A61K35/20; A61K38/00; A61K38/46; C07K1/00; C07K2/00; C07K4/00; C07K14/00; C07K16/00; C12N15/00
- **european:** C07K14/47A21; C12N9/72; C12N15/85; C12N15/85A1
Application number: DE19883854555T 19880623
Priority number(s): US19870065994 19870623; WO1988US02134 19880623

Also published as:

 WO8810118 (A
 EP0347431 (A1
 US4873316 (A1
 EP0347431 (A4
 EP0347431 (B1

Report a data error he

Abstract not available for DE3854555T

Abstract of corresponding document: **US4873316**

This invention relates to the production of recombinant proteins in mammals' milk. Particularly, this invention relates to an expression system comprising the mammal's casein promoter which when transgenically incorporated into a mammal permits the female species of that mammal to produce the desired recombinant protein in or along with its milk. This invention also relates to the transgenic mammal that produces the desired recombinant product in its milk.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

⑧⑦ **EP 0 347 431 B1**

⑩ **DE 38 54 555 T 2**

⑤① Int. Cl.⁸:
A 61 K 35/20

A 61 K 38/00
A 61 K 38/46
C 07 K 1/00
C 07 K 2/00
C 07 K 4/00
C 07 K 14/00
C 07 K 16/00
C 12 N 15/00

DE 38 54 555 T 2

②① Deutsches Aktenzeichen:	38 54 555.1
⑧⑥ PCT-Aktenzeichen:	PCT/US88/02134
⑧⑥ Europäisches Aktenzeichen:	88 906 454.9
⑧⑦ PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 88/10118
⑧⑥ PCT-Anmeldetag:	23. 6. 88
⑧⑦ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	29. 12. 88
⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA:	27. 12. 89
⑧⑦ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	4. 10. 95
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	4. 4. 96

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①

23.06.87 US 65994

⑦③ Patentinhaber:

Gene Pharming Europe B.V., Leiden, NL

⑦④ Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

⑦② Erfinder:

MEADE, Harry, Newton, MA 02158, US; LONGBERG,
Nils, New York, NY 10021, US

⑤④ EXPRESSION VON PROTEINEN IN MILCH.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 54 555 T 2

21. Sep. 1995

1 EP-B-O 347 431
(EP 8890 6454.9)
Gene Pharming Europe BV, et al.
u.Z.: EP-3172

5 EXPRESSION VON PROTEINEN IN MILCH

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft die Produktion von rekombinanten Proteinen in der Milch von Säugetieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Expressionssystem, das einen α -S1-Caseinpromotor umfaßt, der mit einer DNA-Sequenz funktionell verbunden ist, die ein Signalpeptid und ein gewünschtes rekombinantes Proteinprodukt codiert. Bei transgener Integration eines solchen Systems in ein Säugetier wird das rekombinante Protein in der Milch des laktierenden transgenen Säugetiers exprimiert. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein transgenes Säugetier, das das gewünschte rekombinante Produkt in seiner Milch produziert. Rekombinante Produkte, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionssysteme und transgen veränderten Säugetiere produziert werden, können deutlich kostengünstiger als mit herkömmlichen Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine produziert werden.

TECHNISCHER HINTERGRUND

Durch DNA-Rekombinationsverfahren ist die Clonierung und Expression von Genen ermöglicht worden, die wichtige Proteine und Glycoproteine für Medizin und Landwirtschaft codieren. Diese Produkte umfassen beispielsweise Insulin, das Wachstumshormon, den Wachstumshormon-Freisetzungsfaktor, Somatostatin, den Gewebefibrinogen-Aktivator, den Tumornekrosefaktor, Lipocortin, die Gerinnungsfaktoren VIII und IX, Interferone, Koloniestimulierende Faktoren, Interleukine und Urokinase.

Viele dieser wichtigen Proteine sind jedoch groß (Molekulargewichte gehen über 30 Kd hinaus), werden sezerniert, benötigen Sulfhydrylbindungen zur Aufrechterhaltung einer richtigen Faltung, werden glycosyliert und sind gegen Proteasen empfindlich. Folglich hat sich herausgestellt, daß die rekombinante Produktion dieser Produkte in prokaryontischen Zellen alles andere als zufriedenstellend ist, da die gewünschten rekombinanten Proteine nicht korrekt prozessiert, glycosyliert und gefaltet werden. Ein Ausweg war

1 dementsprechend die Produktion dieser rekombinanten Proteine in
gezüchteten eukaryontischen Zellen. Es hat sich herausgestellt, daß diese
Technik teuer und wegen unterschiedlicher Zellzuchtverfahren oft auch
unzuverlässig ist. Die durchschnittliche Ausbeute liegt beispielsweise bei 10 mg
5 rekombinantes Protein pro Liter Kulturmedium, wobei die resultierenden
Kosten typischerweise 1000 Dollar pro Gramm rekombinantes Protein
überschreiten. Als Ausweg wurde dementsprechend die Produktion dieser
rekombinanten Proteine in gezüchteten eukaryontischen Zellen durchgeführt.

Es ist jetzt möglich, die Expression rekombinanter Proteine und deren
10 Sekretion in die Milch transgener Tiere zu steuern. EP-A-0 279 582 betrifft die
Expression des vollständigen beta-Casein-Gens der Ratte und eines Ratten-beta-
Casein-/CAT-Fusionsgens in der Milch transgener Mäuse. WO 88/00239 betrifft
die Produktion rekombinanter Proteine in der Milch von Säugetieren unter
Verwendung eines Expressionskonstrukts, das einen Milchmolkeprotein-
15 Promotor umfaßt. EP-A-0 264 166 betrifft die Verwendung von Promotoren
saurer Molkeproteine zur Steuerung der Expression rekombinanter Proteine
und deren Sekretion in die Milch transgener Säugetiere.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

20 Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung eines
alpha-S1-Casein-Promotors zur Steuerung der Expression rekombinanter
Proteine in transgenen Säugetieren. Erfindungsgemäß wird in einem
Expressionssystem eine DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, mit
einem Promotor eines milchspezifischen Proteins und im besonderen mit
25 einem alpha-S1-Casein-Promotor durch eine DNA-Sequenz funktionell
verbunden, die ein Signalpeptid codiert, das Sekretion und Reifung des
gewünschten Proteins im Mamma-Gewebe gestattet. Besonders bevorzugt
umfaßt das Expressionssystem einen 3'-untranslatierten Bereich stromabwärts
der DNA-Sequenz, die das gewünschte rekombinante Protein codiert. Dieser
untranslatierte Bereich kann das rDNA-Transkript des Expressionssystems
30 stabilisieren. Gegebenenfalls kann das Expressionssystem auch einen 5'-
untranslatierten Bereich stromaufwärts der DNA-Sequenz umfassen, die das
Signalpeptid codiert.

Das Expressionssystem wird mit Hilfe von Standard-Transgenverfahren in
ein Wirtsgenom transgen eingeführt. Dabei wird/werden eine oder mehrere
35 Kopie(n) des Konstrukts oder des Systems in das Genom des transgenen
Säugetieres integriert. Die Gegenwart des Expressionssystems ermöglicht den

weiblichen Säugetieren, das rekombinante Proteinprodukt in oder mit ihrer Milch zu produzieren oder sezernieren. Dieses Verfahren gestattet eine Produktion der gewünschten Proteine bei niedrigen Kosten und in hohen Ausbeuten.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Figur 1 stellt die Konstruktion des erfindungsgemäßen Plasmids pCAS 1151 dar.

DEFINITIONEN

In der vorliegenden Anmeldung und den Patentansprüchen haben die Begriffe "rekombinantes Protein" und "funktionell verbunden" die folgenden Bedeutungen:

"Funktionell verbunden" - die Verbindung eines milchspezifischen Promotors oder eines im Mamma-Gewebe spezifisch aktivierten Promotors, mit einer DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, wodurch die Expression dieser DNA-Sequenz und die Produktion dieses Proteins ermöglicht und gesteuert werden.

"Rekombinantes Protein" - ein Protein oder Peptid, das von einer DNA-Sequenz codiert wird, die nicht zum nativen Genom des Säugetieres gehört, in dessen Milch das Protein/Peptid erfindungsgemäß produziert wird, oder ein Protein oder Peptid, das von einer DNA-Sequenz codiert wird, die, falls sie zum nativen Genom des Säugetieres gehört, in dessen Milch das Protein/Peptid produziert wird, nicht zu einer Produktion des Proteins oder Peptids in gleichem Umfang führt, in dem das erfindungsgemäße transgene Säugetier das Protein in seiner Milch produziert.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren, DNA-Sequenzen, Stoffzusammensetzungen und transgene Säugetiere zur Produktion rekombinanter Proteine. Insbesondere betrifft die Erfindung den transgenen Einbau einer oder mehrerer Kopie(n) eines Konstrukts, das den Promotor eines milchspezifischen Proteins oder insbesondere den alpha-S1-Casein-Promotor umfaßt, der mit einer das gewünschte rekombinante Protein codierenden DNA-Sequenz durch eine DNA-Sequenz funktionell verbunden ist, die ein Signalpeptid codiert, welches die Sekretion und Reifung des gewünschten rekombinanten Proteins im Mamma-Gewebe gestattet. Das Konstrukt wird

1 transgen in Säugerembryonen integriert und das rekombinante Protein wird
anschließend in oder mit der Milch des laktierenden transgenen Säugetieres
exprimiert oder sezerniert.

5 In der vorliegenden Erfindung läßt sich jedes beliebige Säugetier
einsetzen. Vorzugsweise werden Säugetiere verwendet, die große
Milchvolumen produzieren und lange Laktationsperioden besitzen. Bevorzugte
Säugetiere sind Kühe, Schafe, Ziegen, Mäuse, mit Rindern verwandte
Wiederkäuer, Kamele und Schweine. Hinsichtlich einer bestimmten
10 erfindungsgemäßen Expressionssequenz muß natürlich nicht jedes dieser
Säugetiere genauso effizient sein wie die anderen. Beispielsweise kann ein
bestimmter milchspezifischer Promotor oder eine Signalsequenz in einem
Säugetier wirksamer sein als in einem anderen. Ein Fachmann kann jedoch
ohne weiteres die richtige Wahl treffen, wenn er nach den Lehren der
vorliegenden Erfindung arbeitet.

15 Der in der vorliegenden Erfindung verwendete alpha-S1-Casein-Promotor
stammt vorzugsweise vom Rind. Der alpha-S1-Casein-Promotor kann entweder
aus cDNA oder aus genomischen Sequenzen gewonnen werden. Vorzugsweise
stammt er aus genomischen Sequenzen.

20 Erfindungsgemäß verwendete Signalpeptide sind milchspezifische
Signalpeptide oder andere Signalpeptide, die in der Sekretion und Reifung
eukaryontischer oder prokaryontischer Proteine nützlich sind. Das
Signalpeptid ist vorzugsweise ausgewählt aus milchspezifischen Signalpeptiden
oder dem Signalpeptid des gewünschten rekombinanten Proteinprodukts.
Vorzugsweise steht das milchspezifische Signalpeptid mit dem
25 milchspezifischen Promotor, der im erfindungsgemäßen Expressionssystem
verwendet wird, in Beziehung. Die Größe des Signalpeptids ist für die
vorliegende Erfindung nicht entscheidend. Es ist nur erforderlich, daß das
Peptid ausreichend groß ist, damit es zur Sekretion und Reifung des
gewünschten rekombinanten Proteins im Mamma-Gewebe, in dem es
exprimiert wird, kommt.

30 Die Proteinprodukte, die durch die erfindungsgemäßen Verfahren
produziert werden können, umfassen beispielsweise die Gerinnungsfaktoren
VIII und IX, menschliches oder tierisches Serumalbumin, den Gewebe-
Plasminogenaktivator (TPA), Urokinase, alpha-1-Antitrypsin, tierische
Wachstumshormone, den Muller-Hemmstoff (MIS), Zelloberflächenproteine,
35 Insulin, Interferone, Interleukine, Milch-Lipasen, antivirale Proteine,

1 Peptidhormone, Immunglobuline, Lipocortine und andere rekombinante Proteinprodukte.

Das gewünschte rekombinante Protein kann als Fusionsprotein produziert werden, das zusätzlich zu den Aminosäuren des gewünschten oder nativen Proteins weitere Aminosäuren enthält. Um das gewünschte Protein zu stabilisieren oder um es aus Milch einfacher und schneller aufzureinigen zu können, kann das gewünschte erfindungsgemäße rekombinante Protein beispielsweise als Teil eines größeren rekombinanten Proteins produziert werden. Das Fusionsprotein wird dann aufgespalten und das gewünschte Protein isoliert. In einer anderen Ausführungsform kann das gewünschte rekombinante Protein als Fragment oder Derivat des nativen Proteins produziert werden oder es kann so produziert werden, daß es eine ähnliche Aminosäuresequenz wie das native Protein besitzt. Jede dieser Ausführungsformen kann ohne weiteres hergestellt werden, indem lediglich die richtige DNA-Sequenz ausgewählt wird.

Vorzugsweise umfaßt das erfindungsgemäße Expressionssystem oder Konstrukt auch einen 3'-untranslatierten Bereich stromabwärts der DNA-Sequenz, die das gewünschte rekombinante Protein codiert. Dieser Bereich stabilisiert anscheinend das RNA-Transkript des Expressionssystems und erhöht dadurch die Ausbeute des gewünschten Proteins im Expressionssystem. Unter den 3'-untranslatierten Bereichen, die sich in den erfindungsgemäßen Konstrukten verwenden lassen, gibt es Sequenzen, die ein poly A-Signal bereitstellen. Solche Sequenzen können z.B. aus den Sequenzen des kleinen t-Antigens von SV40, dem 3'-untranslatierten Bereich des Casein-Gens oder anderen im Fachgebiet wohl bekannten 3'-untranslatierten Sequenzen stammen. Vorzugsweise stammt der 3'-untranslatierte Bereich aus einem milchspezifischen Protein. Die Länge des 3'-untranslatierten Bereichs ist nicht entscheidend, die stabilisierende Wirkung seines poly A-Transkripts scheint jedoch zur Stabilisierung der RNA der exprimierten Sequenz wichtig zu sein.

Gegebenenfalls können die erfindungsgemäßen Expressions-Kontrollsequenzen auch einen 5'-untranslatierten Bereich zwischen dem Promotor und der das Signalpeptid codierenden DNA-Sequenz enthalten. Diese untranslatierten Bereiche stehen vorzugsweise mit dem Promotor in Beziehung. Sie können jedoch aus anderen synthetischen, halbsynthetischen oder natürlichen Quellen stammen. Auch hier ist ihre spezifische Länge nicht entscheidend, sie scheinen jedoch für die Verbesserung des Expressionsniveaus nützlich zu sein.

1 Die vorstehend beschriebenen Expressionssysteme können unter
Verwendung von Verfahren hergestellt werden, die auf dem Fachgebiet wohl
bekannt sind. Beispielsweise können verschiedene Ligierungsverfahren unter
Verwendung üblicher Linker, Restriktionsstellen, usw., wirkungsvoll
5 verwendet werden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen
Expressionssysteme als Teil größerer Plasmide hergestellt. Wie auf dem
Fachgebiet wohl bekannt, ermöglicht diese Art der Herstellung eine effiziente
Clonierung und Selektion der richtigen Konstruktionen. Am bevorzugtesten
befinden sich die erfindungsgemäßen Expressionssysteme auf dem Plasmid
10 zwischen zweckmäßigen Restriktionsstellen, so daß sie zur Integration in das
gewünschte Säugetier ohne weiteres aus den übrigen Plasmidsequenzen
isoliert werden können.

Nach Isolierung und Reinigung werden die erfindungsgemäßen
Expressionssysteme oder Konstrukte dem Genpool des Säugetieres zugesetzt, das
15 transgen verändert wird. Mit Hilfe von Standard-Transgenverfahren
kann/können beispielsweise eine oder mehrere Kopie(n) des Konstrukts in das
Genom des Säugerembryos integriert werden.

Ein Verfahren zur transgenen Veränderung eines Säugetieres besteht in
der Mikroinjektion des Konstrukts in die Vorkerne der befruchteten Säuger-
Eizelle(n), wodurch eine oder mehrere Kopie(n) des Konstrukts in den Zellen
20 des/der sich entwickelnden Säugetiere(s) erhalten bleiben. Gewöhnlich
enthalten mindestens 40% der Säugetiere, die sich aus den injizierten Eizellen
entwickeln, in somatischen Geweben mindestens eine Kopie des clonierten
Konstrukts. Über die Keimbahn vererben diese "transgenen Säugetiere"
gewöhnlich das Gen an die nächste Generation. Mit Hilfe einer Southern-Blot-
25 Analyse eines Gewebeteils kann die Nachkommenschaft der transgen
manipulierten Embryonen auf das Vorliegen des Konstrukts untersucht
werden. Wenn eine oder mehrere Kopie(n) des außerhalb des Organismus
clonierten Konstrukts im Genom dieser transgenen Embryonen stabil
integriert ist/sind, besteht die Möglichkeit der Etablierung permanenter
30 transgener Säugerlinien, die das transgen zugegebene Konstrukt tragen.

Die Nachkommen transgen veränderter Säugetiere können nach der Geburt
auf Integration des Konstrukts in ihr Genom hin getestet werden. Vorzugsweise
wird dieser Test durchgeführt, indem eine Sonde, die der DNA-Sequenz
entspricht, welche das gewünschte rekombinante Proteinprodukt oder einen
35 Teil davon codiert, mit chromosomalem Material der Nachkommenschaft
hybridisiert wird. Die Säugernachkommen, in deren Genom mindestens eine

Kopie des Konstrukts gefunden wurde, werden bis zur Geschlechtsreife gezüchtet. Die weiblichen Nachkommen produzieren das gewünschte Protein in oder mit ihrer Milch. In einer anderen Ausführungsform werden die transgenen Säugetiere zur Erzeugung weiterer transgener Nachkommen vermehrt, die sich dazu eignen, in ihrer Milch die gewünschten Proteine zu produzieren.

BEISPIELE

BEISPIEL 1 - RINDER-ALPHA-S1-CASEIN

Bei der Herstellung einer Cosmid-Genbank aus Kalbsthymus-DNA wurde das alpha-S1-Casein-Gen vom Rind im Cosmidvektor HC79 (von Boehringer, Mannheim) cloniert, wie von B. Hohn und J. Collins, Gene, **11** (1980), S. 291-298, beschrieben. Aus Thymusdrüsen, die von einem Schlachthof erhalten worden waren, wurde die DNA mit Hilfe von Standardverfahren isoliert, die auf dem Fachgebiet wohl bekannt sind (T. Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", (1982), Seite 271, Cold Spring Harbor Laboratory). Die Cosmid-Genbank wurde unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt (F. Grosveld et al., Gene, **13** (1981), S. 227-231). Die Kalbsthymus-DNA wurde mit Sau3A (New England Bio Labs) teilweise gespalten und zur Anreicherung von 30 bis 40 kb großen Fragmenten auf einem Salzgradienten aufgetrennt. Die teilweise gespaltenen DNA-Fragmente wurden danach mit dem Cosmidvektor HC79 ligiert, der vorher mit BamHI gespalten worden war. Anschließend wurde das Produkt in vitro mit lambda-Proteinextrakten (Amersham) verpackt, wobei nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet wurde. Das in vitro verpackte Material wurde dann zur Infektion des E. coli K12-Stammes HB101 verwendet. Anschließend erfolgte eine Selektion auf 50 µg/ml Ampicillin (Sigma) enthaltenden LB-Platten.

Die Genbank wurde unter Verwendung der 45 Basenpaar großen Oligodesoxyribonucleotid-Sonde CAS-1 untersucht. Die CAS-1-Sequenz: 5'-CATGGCTTGATCTTCAGTTGATTCACCTCCAATATCCTTGCTCAG-3', wurde aus der von I. M. Willis et al., DNA, **1** (1982), S. 375-386, beschriebenen teilweisen cDNA-Sequenz des alpha-S1-Casein-Gens erhalten. Diese Sequenz entspricht den Aminosäuren 20 - 35 des reifen Rinder-Caseins.

Im Ergebnis dieser Untersuchung wurden drei Cosmide isoliert (C9, D4 und E1). Eine teilweise Subclonierung und Sequenzierung von C9 zeigte, daß das Cosmid einen Teil der genomischen Sequenz des alpha-S1-Casein-Gens enthielt.

1 Danach wurden mehrere Oligodesoxyribonucleotid-Sonden synthetisiert,
 die verschiedenen Bereichen der Casein-cDNA entsprachen und auf in der
 Literatur beschriebenen Sequenzen basierten [A. F. Stewart et al., Nucleic Acids
Research, 12 (1984), S. 3895; M. Nagao et al., Agric. Biol. Chem., 48 (1984), S. 1663-
 5 1667]. Eine Restriktionskartierung und Southern-Blot-Analyse [E. Southern, J.
Mol. Biol., 98 (1975), S. 503] bewies, daß die Cosmide D4 und E1 das Strukturgen
 und einen 9 kb großen Abschnitt der stromaufwärts gelegenen oder 5'-
 flankierenden Sequenzen enthielten. Das C9-Cosmid enthielt das Casein-
 Strukturgen und einen 8 kb großen Abschnitt der stromabwärts gelegenen
 10 oder 3'-Sequenzen (vgl. Figur 1). Die Cosmide E1 und D4 wurden in dem Bereich
 sequenziert, der dem Transkriptionsstartpunkt der Casein-Struktursequenz
 entspricht. Es wurde festgestellt, daß die Sequenz der von L. L. Yu-Lee et al.,
Nucleic Acids Res., 14 (1986), S. 1883-1902, beschriebenen Sequenz des gleichen
 Bereichs entspricht.

15 Man kann davon ausgehen, daß sich der Kontrollbereich des alpha-S1-
 Casein-Gens stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt befindet. Nach
 Sequenzierung zeigte sich, daß sich dort das 40 bp große Exon I befindet und
 daß die Signalsequenz von CAS zusammen mit den Sequenzen, die die ersten
 zwei Aminosäuren des reifen CAS-Proteins - Arginin und Glutamin- codieren,
 in Exon II zu finden ist.

20 Das CAS-Promotor-Plasmid wurde wie folgt konstruiert: Die genomische
 Karte von Figur 1 zeigt, daß der Kontroll- oder Promotorbereich zusammen mit
 den Exons I und II als 9 kb großes KpnI-BamHI-Fragment cloniert werden
 kann. Entsprechend wurde das Cosmid E1 mit KpnI sowie BamHI gespalten und
 dann mit Plasmid pUC19 (Bethesda Research Labs) ligiert, das vorher mit KpnI
 25 und BamHI gespalten worden war. Das resultierende Plasmid pCAS 1134 (vgl.
 Figur 1) enthielt den CAS-Promotor und die CAS-Signalsequenz mit einer zur
 Clonierung geeigneten BamHI-Restriktionsstelle.

30 Damit das genomische Konstrukt in einem eukaryontischen Wirt
 funktionieren kann, d.h. zur Durchführung der transgenen Manipulation, bei
 der DNA in den Vorkern injiziert wird, müssen die prokaryontischen
 Sequenzen zuerst entfernt werden. Ein zur Entfernung prokaryontischer
 Sequenzen eingesetztes Verfahren bestand in der Modifizierung von pCAS 1134,
 so daß die eukaryontische DNA von SalI-Restriktionsstellen flankiert wurde. Die
 stromaufwärts vom CAS-Promotor gelegene KpnI-Restriktionsstelle wurde in
 35 eine SalI-Restriktionsstelle umgewandelt, wobei der Linker CAS-11 (5'-GGT CGA
 CCG TAC-3') verwendet wurde, der in das Plasmid im Anschluß an eine KpnI-

1 Spaltung ligiert wurde. Das resultierende Plasmid pCAS 1141 (vgl. Figur I) enthielt SalI-Restriktionsstellen, die den CAS-Promotor und die BamHI-Clonierungsstelle flankierten.

5 BEISPIEL 2 - KONSTRUKTION DES DAS REKOMBINANTE CAS-PRODUKT ENTHALTENDEN KONSTRUKTS

Ein rekombinantes Protein, das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren produziert werden kann, ist der Gewebe-Plasminogenaktivator oder TPA. Wie nachstehend gezeigt, wurde das Casein-Signalpeptid zur Steuerung der Sekretion von TPA aus den Brustdrüsen transgener Mäuse verwendet, die ein erfindungsgemäßes Konstrukt trugen. In diesem Konstrukt wurde die Nucleotidsequenz des Casein-Signalpeptids durch RNA-Prozessierung mit der Sequenz des reifen TPA fusioniert. Die TPA-Sequenz ist in D. Pennica et al., Nature, 301 (1983), S. 214-221, beschrieben. Wie im CAS-Gen gibt es im TPA-Gen in Intron II eine BamHI-Restriktionsstelle, die das Signalpeptid von der reifen Sequenz trennt [R. Fisher et al., J. Biol. Chem., 260 (1985), S. 11223-11230]. Die cDNA von TPA enthält in Exon III bei Aminosäure #3 des reifen TPA eine BglII-Restriktionsstelle.

Ein 1,7 kb großes Fragment aus dem genomischen TPA-Clon [R. Fisher et al., vorstehend] wurde unter Verwendung der BamHI-BglII-Restriktionsstellen subcloniert. Das 1,7 kb große Fragment enthielt einen Teil von Intron II, die 3'-Splicing-Akzeptorstelle und Exon III bis zur BglII-Restriktionsstelle. Dieses 1,7 kb große Fragment wurde verwendet, um die in dem TPA-cDNA-Clon vorhandene TPA-Signalsequenz zu ersetzen, wodurch eine BamHI-Kassette erhalten wurde. Wie in Beispiel 1 gezeigt, gibt es eine in Intron II gelegene BamHI-Restriktionsstelle, die die Sequenz für das Casein-Signalpeptid von der Sequenz des reifen Proteins trennt. Das CAS-Promotorplasmid pCAS 1141 wurde mit BamHI gespalten. Die TPA enthaltende BamHI-Kassette wurde wie in Figur 1 gezeigt in das gespaltene Plasmid ligiert, wodurch das Plasmid pCAS 1151 erhalten wurde, das den CAS-Promotor stromaufwärts der cDNA-Sequenz von TPA enthält. Dieses Konstrukt ermöglicht durch RNA-Prozessierung eine Verknüpfung der TPA-Struktursequenzen mit der Casein-Signalsequenz.

Danach wurde die zur transgenen Veränderung von Säugetieren verwendete DNA isoliert. Die pCAS 1151-DNA wurde mit SalI vollständig gespalten. Nach Elektrophorese auf einem 1%-igen Agarose-TBE-Gel [Maniatis et al., vorstehend] wurde das den eukaryontischen Sequenzen entsprechende 13 kb große Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA durch

1 Elektroelution isoliert. Danach wurde die DNA über Nacht in einem Gleichgewichts-CsCl-Gradienten zentrifugiert. Die DNA-Bande wurde entfernt und extensiv gegen TNE-Puffer (5 mM Tris, pH 7,4, 5 mM NaCl und 0,1 mM EDTA, pH 8) dialysiert.

5 BEISPIEL 3 - TRANSGENE INTEGRATION DES KONSTRUKTS IN MÄUSE

Das Verfahren zur transgenen Integration der gewünschten genetischen Information in den sich entwickelnden Maus-Embryo ist auf dem Fachgebiet etabliert [B. Hogan et al., "Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual", (1986), Cold Spring Harbor Laboratory]. Es wurde eine Kreuzung der F1-Generationen (Sloan Kettering) von C57B1 mit CB6 (Jackson Laboratories) verwendet. Durch Injektion von Gestile (Serum trächtiger Stuten) wurde in 10 sechs Wochen alten Weibchen eine Superovulation initiiert. Zwei Tage später folgte die Verabreichung von menschlichem Chorion-Gonadotropin. Die behandelten Weibchen wurden 24 Stunden später mit C57B1-Zuchtmännchen 15 gekreuzt. Zur Mikroinjektion mit DNA und Implantation in scheinträchtige Weibchen wurden die befruchteten Eizellen vor ihrer Nidation innerhalb von 12 Stunden nach der Paarung entfernt.

Zur Injektion des Konstrukts wurden zuerst die die Eizelle umgebenden Cumuluszellen mit Hyaluronidase verdaut. Das Konstrukt wurde in den Vorkern 20 des Embryos injiziert, bis dieser um 30% bis 50% an Größe zunahm. Die so behandelten Embryonen (262) wurden in die Eileiter scheinträchtiger F1-Weibchen implantiert. Die 262 behandelten und implantierten Embryonen führten zur Geburt von dreiundzwanzig lebensfähigen Jungtieren. Aus ihrem Schwanzgewebe wurde DNA isoliert und Southern-Blot-Analysen unterworfen, 25 wobei mit Hilfe des Nick-Translationsverfahrens markierte pCAS 1151-DNA als Sonde eingesetzt wurde. Es zeigte sich, daß fünf Tiere die CAS-Sequenz enthielten. Zwei weibliche GO-Nachkommen im Alter von sechs Wochen wurden mit Männchen gekreuzt, wobei die G1-Generation erhalten wurde. Die Nachkommen aus diesen Paarungen wurden auf pCAS 1151-Sequenzen hin 30 untersucht, indem aus Schwanzgewebe isolierte DNA mittels Southern-Blot-Analysen untersucht wurde. Die nach der Geburt erhaltenen Weibchen wurden gezüchtet und gemolken. Diejenigen weiblichen Mäuse, die die pCAS 1151-DNA-Sequenz enthielten, produzierten in ihrer Milch TPA, während die Kontrolltiere kein TPA produzierten.

35 Transgene männliche GO-Mäuse wurden mit weiblichen Kontrolltieren gepaart. Bei den G1-Nachkommen wurde DNA, die aus Schwanzgewebe isoliert

worden war, durch Southern-Blot-Analysen untersucht. Weibchen, die die pCAS 1151-Sequenz enthielten, wurden zur Milchgewinnung aufgezogen und gezüchtet. Die G1-Nachkommen produzierten in ihrer Milch 0,2 - 0,5 µg/ml TPA. Danach wurden diese Weibchen mit F1-Wildtyp-Männchen gekreuzt. Die Nachkommen, die die pCAS 1151-DNA-Sequenz enthielten, produzierten die gleichen TPA-Mengen, während die Nachkommen, die die Sequenz nicht enthielten, kein TPA in ihrer Milch produzierten.

BEISPIEL 4 - TRANSGENE INTEGRATION DER MENSCHLICHEN TPA-SEQUENZ IN GROSSEN SÄUGETIEREN

Nach mindestens einer vorherigen Brunstperiode wurde in Schafen eine Superovulation initiiert, bevor diese als Embryonen-Spender verwendet wurden. Insbesondere wurde etwa am 10. Tag des Brunstzyklus jedem Schaf ein mit Progestagen imprägniertes Vaginalschwämmchen implantiert (wobei jedes Schwämmchen 60 mg 6-alpha-Methyl-17-alpha-acetoxy-progesteron enthielt). Das Schwämmchen blieb 12 Tage implantiert. Drei Tage vor Entfernung des Schwämmchens bis zum Tag nach der Entfernung wurde jedes Tier mit Gonadotropin behandelt, wobei durch intramuskuläre Injektion 2,5 mg follikelstimulierendes Hormon vom Schwein zweimal täglich verabreicht wurden. Zu Beginn der Brunst wurden die Schafe entweder mit fertilen Schafböcken gepaart oder intra-uterinär mit 0,2 ml gewaschenem Schafbocksperma pro Gebärmutterhorn künstlich befruchtet. Innerhalb von 72 Stunden nach Entfernung der Schwämmchen wurden befruchtete einzellige Embryonen und Embryonen, bei denen eine Zellteilung bereits stattgefunden hatte, aus dem Fortpflanzungstrakt narkotisierter Schafe durch einen operativen Eingriff gesammelt, indem etwa 6 ml Ham-F-10-Medium, enthaltend 10% hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum, aus der Uterus-Tuben-Verbindung durch das röhrenförmige trichterartige Ende jedes Eileiters retrograd gespült wurden. Die Ausspülungen wurden gesammelt und die Embryonen unter einem präparativen Mikroskop entfernt.

Die Embryonen wurden dann in frisches Ham-F-10-Medium, enthaltend 10% foetales Kälberserum, überführt. Danach wurden sie auf den Objektisch eines invertierenden Mikroskops überführt, das mit Mikromanipulatoren ausgerüstet ist. Nach dem in R. L. Brinster et al., Cell, 27 (1981), S. 223-231, dargelegten Verfahren werden jedem Embryo zahlreiche Kopien eines Konstrukts, wie z.B. die pCAS-Plasmide bis Nr. 1151, mikroinjiziert. Die Embryonen werden in eine Glaspipettenspitze mit 10 ml Ham-F-10-Medium

1 gesaugt und dann 1 - 3 cm tief in das mit Fimbrien besetzte Ende des Eileiters
empfangnisbereiter Schafe eingeführt. Man läßt die Schafe ihre Jungen
austragen. Ihre Nachkommen werden dann auf Integration der TPA
codierenden DNA hin untersucht. Die weiblichen Schafe des transgenen
5 Nachwuchses produzieren in ihrer Milch TPA.

Ein das Plasmid pCAS 1151 enthaltendes erfindungsgemäßes Konstrukt ist
als Kultur in American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, am 23.
Juni 1987 hinterlegt und dort als LE392/pCAS 1151 bezeichnet worden, wobei
sich pCAS 1151 in E. coli K12 befindet. Das Konstrukt hat die Eingangsnummer
10 ATCC 67450 erhalten.

Obwohl vorstehend eine Anzahl von Ausführungsformen der vorliegenden
Erfindung vorgestellt wurde, ist klar, daß die Grundkonstruktion zur
Bereitstellung weiterer Ausführungsformen verändert werden kann, bei
denen die erfindungsgemäßen Verfahren und Mittel verwendet werden.
15 Deshalb wird der Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung eher durch die
angefügten Patentansprüche bestimmt als durch die spezifischen
Ausführungsformen, die vorstehend nur als Beispiele vorgestellt worden sind.

20

25

30

35

1 EP 88 90 6454.9
Gene Pharming Europe BV, et al.

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Verfahren zur Herstellung und Sekretion eines rekombinanten Proteins in Milch von nicht-menschlichen Säugern, umfassend die folgenden Schritte:
- 10 (a) Produktion der Milch in einem transgenen nicht-menschlichen Säuger, gekennzeichnet durch ein Expressionssystem, das einen α S1-Caseinpromotor umfaßt, funktionell verknüpft mit einer DNA-Sequenz, die ein rekombinantes Protein codiert, durch eine DNA-Sequenz, die ein Signalpeptid codiert, das in der Sekretion und Reifung des rekombinanten Proteins
- 15 in Säugergewebe wirksam ist;
- (b) Sammeln der Milch, und
- (c) Isolierung des rekombinanten Proteins aus der Milch.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Expressionssystem einen Rinder- α S1-Caseinpromotor umfaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Expressionssystem pCAS1151 (ATCC 67450) umfaßt.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Expressionssystem auch einen 3'-untranslatierten Bereich stromabwärts der DNA-Sequenz umfaßt, die das rekombinante Protein codiert.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Expressionssystem auch einen 5'-untranslatierten Bereich zwischen dem Promotor und der DNA-Sequenz umfaßt, die das Signalpeptid codiert.
- 35 6. DNA-Sequenz, umfassend einen α S-1-Caseinpromotor, funktionell verknüpft mit einer DNA-Sequenz, die das rekombinante Protein codiert, durch eine DNA-Sequenz, die ein

1 Signalpeptid codiert, das in der Sekretion und Reifung
des rekombinanten Proteins in Säugergewebe wirksam ist.

5 7. DNA-Sequenz nach Anspruch 6, umfassend einen Rinder- α S-
1-Caseinpromotor.

8. DNA-Sequenz nach Anspruch 6, umfassend pCAS 1151 (ATCC
67450).

10 9. DNA-Sequenz nach Anspruch 6, wobei die DNA-Sequenz auch
einen 3'-untranslatierten Bereich stromabwärts der DNA-
Sequenz umfaßt, die das rekombinante Protein codiert.

15 10. DNA-Sequenz nach Anspruch 6, wobei die DNA-Sequenz auch
einen 5'-untranslatierten Bereich zwischen dem Promotor
und der DNA-Sequenz umfaßt, die das Signalpeptid co-
diert.

20 11. Transgener nicht-menschlicher Säuger, der zur Milchbil-
dung fähig ist, umfassend eine DNA-Sequenz nach einem
der Ansprüche 6 bis 10.

25

30

35

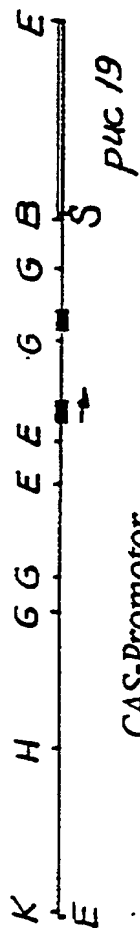
E = EcoRI
 B = BamHI
 G = BglII
 S = SalI
 H = HindIII
 K = KpnI



Spaltung mit KpnI, BamHI Casein-Gen

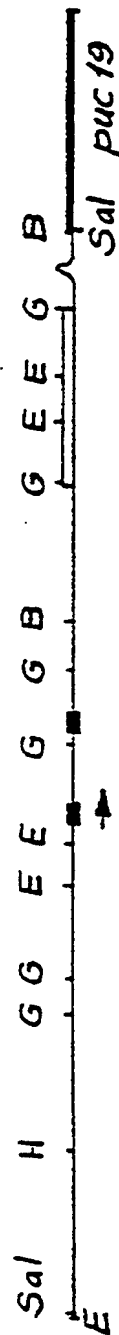
puc 19 / KpnI, BamHI

PCAS 1134



CAS-Promotor

Spaltung mit KpnI
 Ligierung mit dem CAS-11-Linker
 erneute Transformation von E. coli



CAS-Promotor

PCAS 1151